

球毛壳菌 (*Chaetomium globosum*) NK102 纤维素酶基因及其表达条件

胡阳, 毕建男, 郝晓冉, 陈煌, 潘皎, 朱旭东*

南开大学生命科学学院微生物系, 天津 300071

摘要: 【目的】生物质的利用是当前生物技术研究的一个热点。本小组分离到一株高效降解纤维素球毛壳菌 (*Chaetomium globosum*) NK102, 本文拟探索研究此菌的纤维素酶表达系统并寻找影响酶基因表达的关键因素。【方法】通过对 NK102 测序, 本文界定了球毛壳菌 NK102 的主要纤维素酶编码基因, 使用数字基因表达谱升级版 (RNA-Seq) 的方法得到纤维素酶基因的表达差异, 然后观察了营养、物理条件下纤维素酶基因表达和酶活性变化的情况。【结果】发现随着培养时间的延长, 纤维素酶基因整体上表达量升高。在所选基因中, 外切葡聚糖酶、纤维二糖脱氢酶和内切葡聚糖酶基因 (*cbh1*, *cdh* 和 *egl1*) 的表达量最高。糖代谢的负调控因子 ACE I 和 CreA 的随时间表达量均降低, 而 Hap2/3/5 复合体的表达量反而升高。之后检测了不同碳源培养基对纤维素酶基因表达量和酶活性的影响, 发现葡萄糖为强阻遏因子, 纤维二糖为其诱导物, 而山梨醇没有影响。特别是, 我们发现光照也影响纤维素酶基因的表达, 黑暗条件明显抑制酶基因的表达。【结论】转录组学的方法可以初步探索纤维素酶表达的规律, 酶基因的表达受到营养、物理条件的影响。本研究为揭示球毛壳菌降解纤维素分子机理和阐释生物质糖代谢途径提供了有用参考。

关键词: 纤维素酶, 球毛壳菌 (*Chaetomium globosum*), RNA-Seq

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 04-0354-09

纤维素类物质是地球上分布最广、含量最丰富的生物质, 是自然界中数量最大的可再生资源。微生物对纤维素的降解利用, 是自然界中碳素循环的主要环节, 如果加以利用对解决世界能源危机、粮食短缺、环境污染等问题具有十分重要的意义。纤维素不溶于水, 难以水解, 生物分解纤维素至少需要 3 组水解酶的协同作用: 内切葡聚糖酶 (EGs) (EC 3.2.1.4), 水解 β -1,4 糖苷键; 外切葡聚糖酶或纤维二糖水解脱氢酶 (CBHs) (EC 3.2.1.91), 水解 β -1,4 糖苷键, 作用于纤维素线状分子的末端, 每次切下一个

纤维二糖分子; β -葡聚糖苷酶 (BGs) (EC 3.2.1.21), 可将纤维二糖水解脱成葡萄糖分子^[1]。另外, 氧化还原酶如纤维二糖脱氢酶 (CDH) (EC 1.1.99.18) 和糖苷水解酶 (GH) 协同作用, 促进纤维素的酶解糖化^[2-4]。

纤维素酶多为糖蛋白, 酶分子的一级结构由核心催化域 (Catalytic Domain, CD)、纤维素结合结构域家族 1 (Cellulose Binding Domain, CBM1) 和将这两部分相连的链接区 (Linker) 3 部分组成。在大多数真菌中, 降解纤维素是由一系列纤维素酶完成的,

基金项目: 国家自然科学基金 (30970084); 国家“973 项目”——国家重点基础研究计划 (2007CB707801)

* 通信作者。Tel/Fax: + 86-22-23506510; E-mail: xudong82@nankai.edu.cn

作者简介: 胡阳 (1984 -), 女, 河北人, 博士研究生, 主要从事分子真菌学研究。E-mail: huyang840506@126.com

收稿日期: 2012-11-19; **修回日期:** 2013-01-04

它们包含有一个 GH 结构域, 并由 linker 结合至 CBM1^[5]。CBM1 氨基酸序列具有高度保守性, 不受在酶序列中位置 (C 端或 N 端) 的影响^[6]。然而这个结构域不仅在纤维素酶中存在, 在降解半纤维素和其他一些细胞壁结构成分的酶中也发挥着功能^[7]。

对某些纤维素降解真菌研究发现转录调控是纤维素酶表达的关键, 子囊菌中的若干纤维素酶转录调控因子已经被鉴定。例如 XlnR (Xylanase regulator) 和 Xyr1 (Xylanase regulator 1), 曲霉菌 (*Aspergillus* sp.) 和红褐肉座菌 (*Hypocrea jecorina*, 瑞氏木霉的有性型) 的两个木聚糖酶激活因子, 它们对纤维素酶和半纤维素酶降解可利用碳源的转录激活发挥关键性作用^[8-10]。另外在 *H. jecorina* 中还发现了两个纤维素酶的特定转录因子 Ace1 和 Ace2 (Activator of cellulases 1, 2)^[11]。最近对 *H. jecorina* 的研究进一步阐明了 Ace2 对木聚糖酶和 xyr1 基因转录的激活作用^[12]。更重要的是, 大量的调节因子如参与 CCAAT 盒结合的 Hap2/3/5 复合体、碳代谢的抑制因子 (*Aspergillus* sp. 的 CreA 或 *H. jecorina* 的 Cre1) 也调控着纤维素酶基因的转录^[13-14]。尽管许多转录蛋白介导诱导反应的发生, 但是纤维素是如何将信号传递, 并产生纤维素酶的机理还不明确。最近有研究表明, 光照和碳代谢信号通路有密切的关系。调控这一机制的重要因子 ENVOY 蛋白也被发现^[15-16]。

球毛壳菌 (*Chaetomium globosum*) 是一类广泛分布于自然界的子囊菌, 如土壤、植物种子、碎屑、木材以及含纤维素的制品上^[17], 被认为仅次于青霉和曲霉的常见真菌。早在 20 世纪 40 年代, Klemme 等人就从棉纱中分离到球毛壳菌。球毛壳菌可以产生活性较强的纤维素水解酶以分解利用麦秸、咖啡豆、油棕榈树叶等^[18]。虽然许多球毛壳菌也能够分解木质素^[19], 但是研究的热点主要集中于球毛壳菌分解利用纤维素方面^[20-22]。对毛壳菌 *C. cellulolyticum* 和 *C. erraticum* 的研究表明, 3 个内切葡聚糖酶和 1 个 β -葡聚糖苷酶构成了纤维素酶的催化中心, 且这些酶的产量受到底物的影响^[23-24]。一些工作表明, 由于可以分泌大量的 β -葡糖苷酶, 球毛壳菌显著优于瑞氏木霉 (*Trichoderma reesei*)。然而, 相对瑞氏木霉等, 球毛壳菌的纤维素酶的研究较少, 特别是分子生物学工作基本是空白, 纤维素酶编码基因大部分

尚不清楚, 随菌株变化较大、影响其表达的因素鲜有报道。近年来, 各种组学技术为揭示细胞生理活动规律和分子机理的研究提供了重要的手段。通过对同一物种不同样品间进行转录组分析, 可获得样品间的表达规律, 这对于揭示基因表达与培养条件的关系具有重要的意义。*C. globosum* NK102 基因组测序的基本完成, 方便了纤维素降解过程的研究和真菌资源的开发利用, 丰富了真菌降解纤维素的知识, 有利于在 *C. globosum* 中发现新的参与纤维素降解的基因和新型真菌纤维素酶。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

本实验培养基配制所用化学试剂均购自北京鼎国生物试剂有限公司; TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司; RNase-free DNase 和 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 试剂盒购自 TaKaRa 公司。使用主要仪器包括: 常规 PCR 仪 (Bio-Rad)、安捷伦 2100 生物分析仪 (Agilent 2100 bioanalyzer)、Illumina HiSeq™ 2000 测序平台 (Illumina Inc., USA)。

1.2 菌株和培养条件

1.2.1 菌株: 球毛壳菌 *C. globosum* NK102 野生型为本实验室分离自北京。

1.2.2 培养基: PDA 固体培养基或者 PDB 液体培养基用于 NK-102 的基本培养。刚果红培养基 (微晶纤维素为碳源) 和 CMC 培养基^[25] 用于观察降解纤维素的表型。微晶纤维素液体培养基 (MCC) 按照 Umikalsom 等人的方法 (1/L)^[26]: 微晶纤维素 10 g, (NH₄)₂SO₄ 1.4 g, KH₂PO₄ 2.0 g, 尿素 0.3 g, MgSO₄·7H₂O 0.3 g, CaCl₂ 0.3 g, 蛋白胨 1.0 g, 微量元素 (含 FeSO₄·7H₂O 5 mg/L, MnSO₄·H₂O 1.56 mg/L, ZnCl₂ 1.67 mg/L, CoCl₂ 2.0 mg/L)。不同碳源试验中, 在 MCC 中各加入 10 g/L (1%) 的葡萄糖, 山梨醇和纤维二糖。

1.2.3 培养条件: NK-102 接种于各培养基中, 28℃ 培养, 液体培养基需震荡培养。均放于培养箱中 24 h 光照培养, 黑暗处理的培养基使用锡箔纸包裹三角瓶。

1.3 RNA 提取和 RT-PCR 反应

1.3.1 RNA 提取: 菌丝尖端接种法将 NK102 接种于 200 mL 的 MCC 培养基中, 于 28℃ 培养箱中, 以

180 r/min 的转速连续振荡培养 5 d 和 9 d, 菌丝冷冻干燥研磨后用 TRIzol 提取。总 RNA 用 RNase-free DNase 进行消化处理。RNA 质量使用安捷伦 2100 生物分析仪 (Agilent 2100 bioanalyzer) 进行检测。

1.3.2 引物: 纤维素酶基因 (*cbh1*, *cdh*, *egl1*) 使用相应的引物进行 RT-PCR 扩增 (表 1)。

表 1. 实验中所用引物

Table 1. Primers used in this work

| Primer name | Sequence (5'→3') |
|-------------|-------------------------|
| Actin (s) | AACCGAGGCTCCCATCAAC |
| Actin (as) | TCACGGACGATTTCACGCTC |
| CBH1 (s) | CGATGGTCTTGAAGTGGTTGTT |
| CBH1 (as) | TTCACCCCTCGTGACCCAGT |
| CDH (s) | CTTCTCGGGTGTTCAGATGTGGG |
| CDH (as) | TCACGATCCGGGAGATCGTAGAC |
| EGL1 (s) | GACGCCTGAAGTCCATCCCAA |
| EGL1 (as) | CTGCTGGTGTAGTCGGTGCCTT |

1.3.3 RT-PCR 反应: cDNA 第一链的合成使用 1 μ g 总 RNA 作为模板, Oligo (dT) 作为引物, 在 M-MLV 反转录酶作用下进行。具体步骤参照 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 试剂盒 (TaKaRa, 大连) 说明书。actin 基因作为内参基因, 使用引物 Actin (s) / Actin (as) 进行扩增。

1.4 RNA-Seq 及数据分析 *C. globosum* NK102 的高通量测序及数据分析于深圳华大基因公司进行 (<http://en.genomics.cn/navigation/index.action>)。数字基因表达谱升级版 (RNA-Seq) 是用来研究某一生物对象在特定生物过程中基因表达差异的技术, 该技术结合了转录组测序建库的实验方法与数字基因表达谱 (Digital Gene Expression Tag Profiling, DGE) 的信息分析手段。RNA-Seq 的实验步骤: 两个样品 (NK102 培养 5 d 和 9 d, CG5 和 CG9) 提取总 RNA 后, 用带有 Oligo (dT) 的磁珠富集 mRNA, 使其片段化后反转录, 在 cDNA 两端加上测序接头, 再经琼脂糖凝胶电泳回收目的大小片段, 并进行 PCR 扩增, 从而完成整个文库制备工作, 构建好的文库用 Illumina HiSeq™ 2000 进行测序, 直到获得足够的序列, 所得序列通过比对 (有参考基因组) 或从头组装 (de novo assembling) (无参考基因组) 形成全基因组范围的转录谱。本实验中参考基因为已测序的 NK102 基因组数据库 (本实验室保存)。

差异表达基因的筛选参照 Audic 等人^[27] 的基于测序的差异基因检测方法, 使用严格的算法筛选

两样本间的差异表达基因, 即 FDR (False Discovery Rate) ≤ 0.001 且倍数差异不低于 2 倍的基因 ($|\log_2 \text{Ratio}| \geq 1$)。基因表达量的计算使用 RPKM 法 (Reads Per Kb per Million reads)^[28]。

1.5 酶活和含糖量的测定

内切酶活性使用羧甲基纤维素酶 (CMCase) 的测定方法, 外切酶活性使用滤纸酶 (FPase) 酶活的测定方法^[29]。1 个酶活力单位 (U) 等于酶促反应中每分钟生成 1 μ mol 葡萄糖 (用还原糖表示) 所需的酶量。

2 结果

2.1 *C. globosum* NK102 具有降解纤维素的能力

如图 1 所示, *C. globosum* NK102 在刚果红 (左) 和 CMC 培养基 (右) 培养 7 天, 均产生水解圈, 说明能够降解纤维素。刚果红培养基上的水解圈不是很清晰, 且菌落生长缓慢, 这可能跟刚果红具有毒性有关。而 CMC 培养基克服了这些缺点, 用碘-碘化钾染色的方法可以产生清晰的水解圈分界线, 并且菌落生长不受到影响。

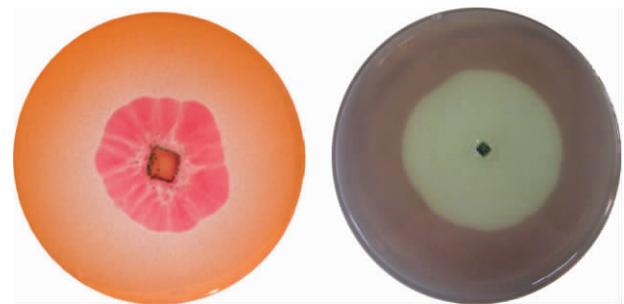


图 1. *C. globosum* NK102 在刚果红 (左) 和 CMC 培养基 (右) 降解纤维素产生水解圈

Figure 1. The phenotype of *C. globosum* NK102 on the Congo Red medium and CMC medium.

2.2 球毛壳菌中纤维素酶分析及主要纤维素酶基因的差异表达谱

以数据库 Carbohydrate-Active EnZymes (CAZy) database (<http://www.cazy.org/>) 中 GH family 蛋白的氨基酸序列作为参考序列, 与 *C. globosum* NK102 基因组数据库进行蛋白同源性 blast 比对, P 值 $\leq e^{-10}$ 。之后统计了不同种类 GH family 蛋白的基因数目 (表 2)。*C. globosum* NK102 中共有纤维素酶 74 个, 半纤维素酶 33 个。这远比 *T. reesei*^[30] 中的

纤维素酶 (34 个) 和半纤维素酶 (8 个) 要多。NK102 中编码 GH61 和 GH7 家族的基因分别有 30 和 8 个, 而 CAZy 数据库记录的真菌中编码 GH61 和

GH7 家族的基因最多为 20 个和 6 个。NK102 另外几个家族的基因数目则与 CAZy 数据库记录的相应基因的最大值相同, 例如 GH12、GH62 和 GH67。

表 2. *Chaetomium globosum* NK102 与 *Trichoderma reesei* 的纤维素酶和半纤维素酶数目比较

Table 2. Comparison of expressed cellulase- and hemicellulose-degrading enzymes number of *Chaetomium globosum* NK102 and *Trichoderma reesei*

| Putative GH family | Cellulase | | | | | | | | | | Hemicellulase | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|-----------|----|----|---|---|---|----|----|----|----|---------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 3 | 5 | 6 | 7 | 9 | 12 | 45 | 48 | 61 | 10 | 11 | 26 | 29 | 43 | 51 | 53 | 54 | 62 | 67 | 74 | 95 |
| <i>Trichoderma reesei</i> | 2 | 13 | 11 | 1 | 2 | 0 | 2 | 1 | 0 | 2 | 1 | 3 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Chaetomium globosum</i> NK102 | 1 | 15 | 8 | 7 | 8 | 0 | 4 | 1 | 0 | 30 | 6 | 8 | 0 | 0 | 4 | 1 | 1 | 0 | 3 | 1 | 2 | 1 |

C. globosum NK102 中, MCC 培养基两个时间点的基因表达谱 (CG5 和 CG9) 比较分析发现, 淀粉和糖代谢过程 (Starch and sucrose metabolism) 中就有 72 个基因或蛋白表达呈现显著变化, 其中有 62 个基因显著上调 (未发表数据)。CG5 的 RPKM 分布在 6.2 - 1122.5 之间, CG9 的 RPKM 分布在 0.5 - 305.3 之间。根据 Longoni 等人^[31] 研究 *C. globosum* 中参与微晶纤维素降解过程的基因, 本实验在已经测序的 NK102 基因中挑选出其中 10 个最重要的不同 GH 家族的纤维素酶基因及 5 个调控因子进行分析比较 (表 3)。RNA-seq 结果显示, 在 NK102 中, CHGG_08330, CHGG_03380 和 CHGG_01188 的表达量是最高的。CHGG_08330 的表达水

平极高, 培养 5 天和 9 天时的 RPKM 分别为 810.5 和 1122.5, 是 CHGG_10762 的 50 倍左右。CHGG_08591 和 CHGG_07593 的表达量极低, 均小于 10。实时定量 qRT-PCR 实验结果表明, RPKM 值小于 10 的基因基本上检测不到表达量 (未发表数据)。从两个样品 (NK102 培养 5 d 和 9 d) 之间的差异看, 随着培养时间的延长, 纤维素酶基因整体上表达量是升高的。其中 CHGG_01188, CHGG_10762, CHGG_08591, CHGG_03380 和 CHGG_03415 有显著性升高 ($|\log_2 \text{Ratio}| \geq 1$)。糖代谢的负调控因子 ACE1 和 CreA 的表达量均降低, 而 Hap2/3/5 复合体的表达量反而升高。

表 3. 不同培养时期 *C. globosum* NK102 纤维素酶基因表达情况和基因功能预测

Table 3. The expression and function prediction of cellulase genes in different culture periods in *C. globosum* NK102.

| <i>C. globosum</i> gene ID (NCBI) | <i>C. globosum</i> NK102 gene name | Protein Predicted by Longoni et al. ^[31] | CG5-RPKM | CG9-RPKM | log ₂ Ratio (CG9/CG5) | Up/Down-Regulation (CG9/CG5) |
|-----------------------------------|------------------------------------|---|----------|----------|----------------------------------|------------------------------|
| CHGG_08509 | <i>egl2</i> | GH5 | 25.0 | 29.8 | 0.3 | Up |
| CHGG_01188 | <i>egl1</i> | GH45 | 97.7 | 246.6 | 1.3 | Up |
| CHGG_08330 | <i>cbh1</i> | GH7 | 810.5 | 1122.5 | 0.5 | Up |
| CHGG_08475 | <i>cbh1</i> | GH7 | 44.6 | 46.9 | 0.1 | Up |
| CHGG_10762 | <i>cbh2</i> | GH6 | 11.2 | 22.1 | 1.0 | Up |
| CHGG_08591 | <i>cbh2</i> | GH6 | 0.4 | 1.8 | 2.3 | Up |
| CHGG_03380 | <i>cdh</i> | CDH | 149.1 | 825.0 | 2.5 | Up |
| CHGG_07593 | <i>gh61</i> | GH61 | 1.4 | 0.0 | -10.4 | Down |
| CHGG_03415 | <i>gh61</i> | GH61 | 13.5 | 88.4 | 2.7 | Up |
| CHGG_09551 | <i>bgl1</i> | GH16 | 41.4 | 34.9 | -0.2 | Down |
| CHGG_00776 | <i>ace1</i> | ACE I | 1116.3 | 828.1 | -0.4 | Down |
| CHGG_03907 | <i>Cre1</i> | CreA | 249.0 | 159.1 | -0.6 | Down |
| CHGG_05974 | Hap2 | Hap2 | 288.8 | 347.7 | 0.3 | Up |
| CHGG_01529 | Hap3 | Hap3 | 37.6 | 87.8 | 1.2 | Up |
| CHGG_03369 | Hap5 | Hap5 | 64.6 | 104.1 | 0.7 | Up |

2.3 不同碳源对纤维素酶基因表达和酶活性的影响

根据 RNA-seq 的结果分析, 本实验将之后的实

验培养条件均定在了 9d。本实验利用 RT-PCR 的方法观察不同碳源培养 NK102 后纤维素酶基因的表达情况。由于 CHGG_08330, CHGG_03380 和

CHGG_01188 (*cbh1*, *cdh* 和 *egl1*) 3 个基因的表达量占绝对优势,且分别行使不同功能,所以主要检测了这 3 个基因的表达情况。

由图 2-A 可以看出,3 个纤维素酶基因在 MCC 培养基中均表达,且 CHGG_08330 较其它两个基因的表达量要高,这与 RNA-seq 结果相符。葡萄糖培养基中只有 CHGG_01188 有极少量的表达,其它两个基因不表达,说明葡萄糖阻遏纤维素酶的合成。并由此可以推断 CHGG_01188 为内切葡聚糖酶 EG,即在无纤维素作为底物的时候也能够表达。在 MCC 中加入 1% 葡萄糖,3 个纤维素酶基因有少量表达,由此推测 *C. globosum* 先利用葡萄糖,消耗完之后再利用微晶纤维素。纤维二糖能够提高纤维素酶基因的表达量,但山梨醇并没有显著性影响。

从整体来看,内切酶 (CMCase) 和外切酶 (FPase) 在不同碳源培养基中的变化趋势一致 (图 2-B)。在仅有葡萄糖作为碳源的培养基中,酶活性最低。CMCase 活性仅为 0.046 U/ml,FPase 活性基本检测不到。在 MCC 培养基中加入葡萄糖有相同的效果,酶活性均降低。加入纤维二糖的培养基中,酶活性均有提高。CMCase 酶活提高了 33.7%,FPase 酶活提高了 94.9%。而山梨醇对纤维素酶活性影响不大。

观察不同液体培养基中菌体的表型 (图 2-C) 可以发现,*C. globosum* 可以利用微晶纤维素,在降解微晶纤维素后,液体培养基由浑浊转为澄清,呈现黄色或橙色。MCC 培养基和加入纤维二糖的培养基最为澄清,加入葡萄糖的培养基最为浑浊,说明纤维

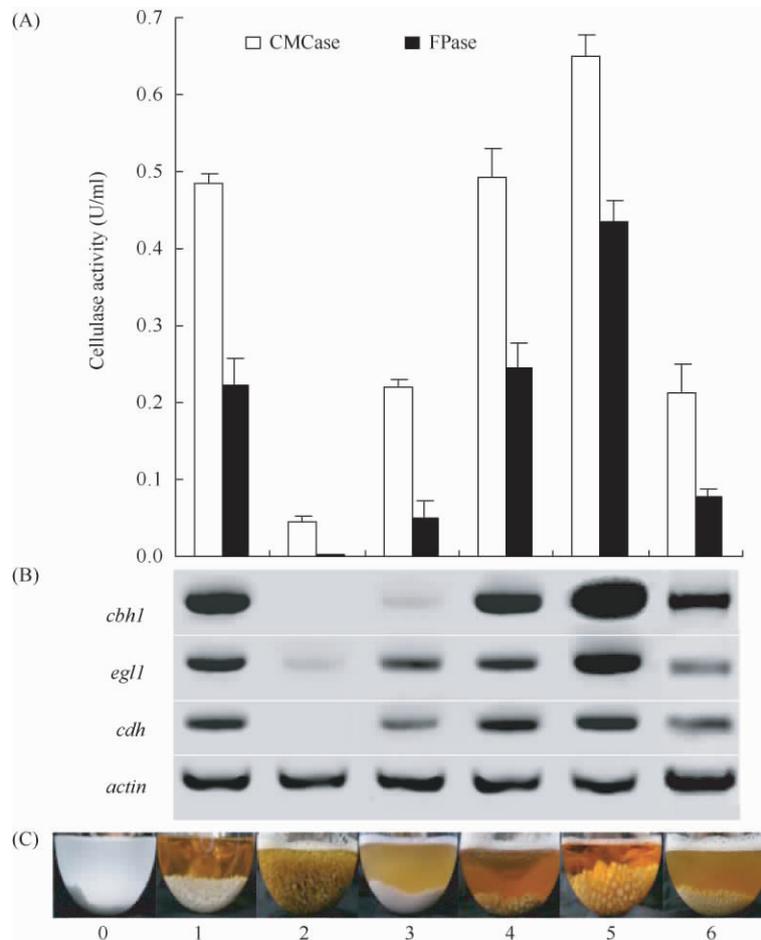


图 2. 不同碳源和光照对 *C. globosum* NK102 纤维素酶基因和酶活性的影响

Figure 2. Effect of different carbon sources and light on the expression of cellulase genes and cellulase activity. A: The effect of different carbon sources and light cellulase activity. B: The effect of different carbon sources and light on the expression of cellulase genes. C: The phenotype of *C. globosum* NK102 cultured in different mediums. 1: 1% MCC; 2: 1% glucose; 3: 1% MCC + 1% glucose; 4: 1% MCC + 1% sorbitol; 5: 1% MCC + 1% cellobiose; 0: 1% MCC without inoculation; 6: 1% MCC in dark condition (1-5, all in light condition).

素降解能力弱。只以葡萄糖作为碳源的培养基比较粘稠, 菌体均匀分布在液体中。这些表型与上述基因表达及活性测定的结果相符。

2.4 光照对纤维素酶基因表达和酶活性的影响

如图 2-A 所示, 与光照条件相比, 在完全黑暗的条件下, 纤维素酶基因表达有所下降, 其中 *egl1* 和 *cdh* 基因的表达量明显下降。与此对应的酶活性也降低, CMCase 酶活降低了 56.2%, FPase 酶活降低了 65.0% (图 2-B)。黑暗条件下 *C. globosum* 在 MCC 培养基中比光照条件下要浑浊, 颜色深, 且菌丝球很小, 生长缓慢 (图 2-C)。

3 讨论

在自然界能够降解木质纤维素的微生物中, 最为重要的是真菌。木质纤维素降解为小分子糖的整个过程非常复杂, 至少几十种酶参与, 相互协同作用, 破坏植物细胞壁的复杂结构, 从而降解木质素、纤维素和半纤维素。在木质纤维素降解真菌中, 研究最多的是白腐菌。球毛壳菌作为一类降解纤维素的子囊菌也越来越受到重视。随着组学时代的来临, 真菌降解木质纤维素的功能基因组学研究进展很快, 给深入理解这一复杂生物学途径和生物质利用提供了新的思路。

C. globosum NK102 基因组数据库与 CAZy 数据库 GH 家族蛋白同源性比对的结果显示, NK102 的纤维素酶基因种类和数目都远大于 *T. reesei*, 表明此菌在降解纤维素方面具有巨大的研究潜力 (表 2)。本文中利用转录组分析的方法列出了主要纤维素酶基因的表达情况, 可以发现随着培养时间的延长, 纤维素酶基因的表达量上升 (表 3)。Longoni 等人^[31] 使用荧光实时定量的方法发现 CHGG_08330 和 CHGG_08475 在微晶纤维素培养基 (MCC) 中并不表达, 只有在木屑培养基 (MPW) 中才表达。与此不同, 我们发现 RNA-seq 结果显示这两个基因在 MCC 中均有表达, 并且预测为 CBH1 基因的 CHGG_08330 的表达水平极高, 表明在纤维素的降解中可能起到重要的作用。

与 *H. jecorina* 的 ACEI 蛋白的 DNA 结合位点有 93% 的同源性的 CHGG_00776, 其表达量与纤维素酶基因的表达量成反相关, 表明在 *C. globosum* 的 *ace1* 基因可能是转录抑制因子。这与 *H. jecorina* 的

研究结果相同, *ace1* 基因作为转录抑制因子, 其敲除突变株纤维素酶和半纤维素酶的表达量均上升^[11]。但也有相反的研究结果, 如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的 Ace1 却是转录激活因子^[32]。在 NK102 中并没有发现 Ace2 和 XlnR 的同源蛋白。同样地, *Aspergillus* 属也没有 Ace2^[11]。但 Longoni 等人^[31] 研究的 *C. globosum* 中却还有 XlnR 蛋白, 这表明同一属的不同菌种之间的纤维素酶基因表达也存在着差异。碳代谢的抑制因子 CreA 与预期相符, 呈现出与纤维素酶基因表达反相关的表达趋势。这与 *Aspergillus* sp. 的 CreA 和 *H. jecorina* 的 Cre1 相同, 参与可利用碳源存在时的转录抑制过程^[13-14]。Hap2/3/5 复合体表达量的上升, 表明在 *C. globosum* NK102 中可能扮演着转录激活因子的角色 (表 2)。

纤维素酶基因的表达是需要诱导物诱导, 纤维素, 乳糖和槐糖均为纤维素基因表达的诱导物。然而葡萄糖抑制诱导物的利用。纤维素酶基因的基础表达水平是建立在能够快速分解的碳源被抑制的基础上^[33-35]。本研究结果表明葡萄糖也是 NK102 纤维素酶合成的阻遏剂, 纤维二糖是激活剂, 山梨醇没有影响, 这与 Ilmen 等人^[33] 研究 *T. reesei* 的结果类似。且酶活特性与表达量息息相关 (图 2)。

诱导物固然是纤维素降解过程的关键, 但是诱导物是如何将信号传递, 并产生纤维素酶的机理还不明确。最近有研究表明, 光和碳代谢信号通路有密切的关系。调控这一机制的重要因子 ENVOY 蛋白也被发现, ENVOY 不仅调控 *H. jecorina* 的光反应还影响碳代谢和光依赖的许多基因的表达^[15-16]。ENVOY 的功能在于连接光反应和诱导物, 使纤维素酶基因表达。进一步研究发现, G 蛋白 α 亚基 GNA3 参与光介导的纤维素酶基因的表达, 且在光照条件的诱导下, *H. jecorina* 纤维素酶基因的表达量明显上升^[36-37]。本实验首次发现光照能够显著提高球毛壳菌纤维素酶基因表达, 可能是一个激活信号 (图 2)。另外, 本实验室近期研究还发现, G 蛋白 α 亚基 GNA1 介导的 cAMP 通路调控 NK102 中纤维素酶基因的表达 (未发表数据), 但调控机制与 *H. jecorina* 不尽相同。

4 小结

如何将生物质降解为单糖是生物质利用的重要

瓶颈。要提高生物质降解酶系的效率,生物质降解的分子基础远没有阐明,而新一代各类组学技术提供了极为重要的新思路。生物质降解分子机理的阐明,必将大大加快高效纤维素酶系的研发进程,为全面实现生物质的真正利用提供理论支撑。本研究使用数字基因表达谱升级版(RNA-seq)检测并分析比较 *C. globosum* 不同生长阶段的纤维素酶基因的表达量,并预测了一些重要基因的功能。这是首次使用转录组学的方法对 *C. globosum* 进行功能基因组学研究。另外,还检测了不同碳源培养基以及光照对纤维素酶基因表达量和酶活性的影响。本研究为揭示球毛壳菌降解纤维素分子机理和阐释生物质糖代谢途径提供了有用参考。

参考文献

- [1] Mach-Aigner AR, Pucher ME, Steiger MG, Bauer GE, Preis SJ, Mach RL. Transcriptional regulation of *xyl1*, encoding the main regulator of the xylanolytic and cellulolytic enzyme system in *Hypocrea jecorina*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (21) : 6554-6562.
- [2] Harris PV, Welner D, McFarland K, Re E, Navarro Poulsen JC, Brown K, Salbo R, Ding H, Vlasenko E, Merino S. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. *Biochemistry*, 2010, 49 (15) : 3305-3316.
- [3] Hori C, Igarashi K, Katayama A, Samejima M. Effects of xylan and starch on secretome of the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* grown on cellulose. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, 321 (1) : 14-23.
- [4] Langston JA, Shaghasi T, Abbate E, Xu F, Vlasenko E, Sweeney MD. Oxidoreductive cellulose depolymerization by the enzymes cellobiose dehydrogenase and glycoside hydrolase 61. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77 (19) : 7007-7015.
- [5] Wilson DB. 2008. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125 : 289-297.
- [6] Rabinovich ML, Melnick MS, Bolobova AV. 2002. The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. *Biochemistry*, 67 (8) : 850-871.
- [7] Hervé C, Rogowski A, Blake AW, Marcus SE, Gilbert HJ, Knox JP. Carbohydrate-binding modules promote the enzymatic deconstruction of intact plant cell walls by targeting and proximity effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107 (34) : 15293-15298.
- [8] Gielkens MM, Dekkers E, Visser J, de Graaff LH. Two cellobiohydrolase-encoding genes from *Aspergillus niger* require D-xyllose and the xylanolytic transcriptional activator XlnR for their expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65 (10) : 4340-4345.
- [9] Stricker AR, Grosstessner-Hain K, Würleitner E, Mach RL. Xyl1 (xylanase regulator 1) regulates both the hydrolytic enzyme system and D-xyllose metabolism in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryotic Cell*, 2006, 5 (12) : 2128-2137.
- [10] Andersen MR, Vongsangnak W, Panagiotou G, Salazar MP, Lehmann L, Nielsen J. A trispecies *Aspergillus* microarray: comparative transcriptomics of three *Aspergillus* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105 (11) : 4387-4392.
- [11] Stricker AR, Mach RL, de Graaff LH. Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78 (2) : 211-220.
- [12] Stricker AR, Trefflinger P, Aro N, Penttilä M, Mach RL. Role of Ace2 (activator of cellulases 2) within the *xyn2* transcriptosome of *Hypocrea jecorina*. *Fungal Genetics and Biology*, 2008, 45 (4) : 436-445.
- [13] Aro N, Pakula T, Penttilä M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29 (4) : 719-739.
- [14] Flipphi M, van de Vondervoort PJI, Ruijter GJG, Visser J, Arst Jr HN, Felenbok B. Onset of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278 (14) : 11849-11857.
- [15] Schmoll M, Franchi L, Kubicek CP. Envoy, a PAS/LOV domain protein of *Hypocrea jecorina* (*Anamorph Trichoderma reesei*), modulates cellulase gene transcription in response to light. *Eukaryot Cell*, 2005, 4 (12) : 1998-2007.
- [16] Schuster A, Kubicek CP, Friedl MA, Druzhinina IS, Schmoll M. Impact of light on *Hypocrea jecorina* and the multiple cellular roles of ENVOY in this process. *BMC Genomics*, 2007, 8 : 449.
- [17] Domsch KH, Gams W, Anderson TH. *Compendium of Soil Fungi*. London: Academic Press, 1980: 1-667.
- [18] Umikalsom MS, Ariff AB, Shamsuddin ZH, Tong C,

- Hassan M, Karim M. Production of cellulase by a wild strain of *Chaetomium globosum* using delignified oil palm empty-fruit-bunch fibre as substrate. *Applied microbiology and biotechnology*, 1997, 47 (5) :590-595.
- [19] Savory JG, Pinion LC. Chemical aspects of decay of beech wood by *Chaetomium globosum*. *Holzforchung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*, 1958, 12 :99-103.
- [20] Kamal L, Mathur SN. Cellulolytic activities of *Chaetomium globosum* on different cellulosic substrates. *World Journal of Microbiology*, 1990, 6 (1) :23-26.
- [21] Umikalsom MS, Ariff AB, Karim MIA. Saccharification of pretreated oil palm empty fruit bunch fiber using cellulase of *Chaetomium globosum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46 (8) :3359-3364.
- [22] Manoliu A, Oprick L, Creanga D. The influence of the static magnetic field (SMF) on some biochemical parameters in cellulolytic fungi *Chaetomium globosum* and *Trichoderma viride* cultivated on media supplemented with panification industrial wastes. *Romanian Journal of Biology Plant Biology*, 2006, 51-52 :25-37.
- [23] Ankudimova NV, Baraznenok VA, Becker EG, Okunev ON. Cellulase complex from *Chaetomium cellulolyticum*: isolation and properties of major components. *Biochemistry*, 1999, 64 (9) :1068-1073.
- [24] Sandhu DK, Puri R. The developmental patterns of endo- β -glucosidase of *Chaetomium erraticum*. *Canadian Journal of Botany*, 1988, 66 (11) :2162-2166.
- [25] Kasana RC, Salwan R, Dhar H, Dutt S, Gulati A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current Microbiology*, 2008, 57 (5) :503-507.
- [26] Umikalsom M, Ariff A, Zulkifli H, Tong C, Hassan M, Karim M. The treatment of oil palm empty fruit bunch fibre for subsequent use as substrate for cellulase production by *Chaetomium globosum* Kunze. *Bioresource Technology*, 1997, 62 (1-2) :1-9.
- [27] Audic S, Claverie JM. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Research*, 1997, 7 :986-95.
- [28] Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 2008, 5 :621-628.
- [29] Wood TM, Bhat KM. Method for measuring cellulase activities. *Methods in Enzymology*, 1988, 160 :87-112.
- [30] Wang TY, Chen HL, Lu MY, Chen YC, Sung HM, Mao CT, Cho HY, Ke HM, Hwa TY, Ruan SK. Functional characterization of cellulases identified from the cow rumen fungus *Neocallimastix patriciarum* W5 by transcriptomic and secretomic analyses. *Biotechnol Biofuels*, 2011, 4 :24.
- [31] Longoni P, Rodolfi M, Pantaleoni L, Doria E, Concia L, Picco AM, Cella R. Functional analysis of the degradation of cellulosic substrates by a *Chaetomium globosum* endophytic isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (10) :3693-3705.
- [32] Aro N, Ilmén M, Saloheimo A, Penttilä M. ACEI of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (1) :56-65.
- [33] Ilmen M, Saloheimo A, Onnela ML, Penttila ME. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63 (4) :1298-1306.
- [34] Schmoll M, Kubicek CP. Regulation of *Trichoderma* cellulase formation: lessons in molecular biology from an industrial fungus. A review. *Acta Microbiologica Immunologica Hungarica*, 2003, 50 (2-3) :125-145.
- [35] Seiboth B, Gamauf C, Pail M, Hartl L, Kubicek CP. The D-xylose reductase of *Hypocrea jecorina* is the major aldose reductase in pentose and D-galactose catabolism and necessary for β -galactosidase and cellulase induction by lactose. *Molecular Microbiology*, 2007, 66 (4) :890-900.
- [36] Schmoll M, Schuster A, do Nascimento Silva R, Kubicek CP. The G- α protein GNA3 of *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*) regulates cellulase gene expression in the presence of light. *Eukaryot Cell*, 2009, 8 (3) :410-420.
- [37] Seibel C, Gremel G, do Nascimento Silva R, Schuster A, Kubicek CP, Schmoll M. Light-dependent roles of the G-protein α subunit GNA1 of *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*). *BMC Biology*, 2009, 7 :58.

Genes for cellulose-degradation and their expression conditions in *Chaetomium globosum* NK102

Yang Hu, Jiannan Bi, Xiaoran Hao, Huang Chen, Jiao Pan, Xudong Zhu*

State Key Program of Microbiology, Department of Microbiology, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: [Objective] Use of renewable plant biomass is an active area in current biotechnology research. This report explores the cellulose-degradation system and the factors affecting cellulase gene expression in *Chaetomium globosum* NK102. [Methods] In the sequenced genome, we identified 10 cellulase genes by sequence homology alignment. We used a high-throughput sequencing technology (RNA-Seq) to monitor the differential expression of the genes under different culture conditions. [Results] We observed that cellulase activity increased with time in the fungal cultures. Accordingly, transcription of the genes encoding cellobiohydrolase, cellobiose dehydrogenase and endoglucanase (*cbh1*, *cdh* and *egl1*) was higher than the others. Expression of the transcriptional repressors, ACE I and CreA, decreased with the time, whereas expression of Hap2/3/5 complex was upregulated. In different carbon sources, cellulase activity and their gene transcription were repressed by glucose and were activated by cellobiose. Sorbitol had no significant effect. Interestingly, light affected positively the expression of these cellulase genes. [Conclusion] Differential RNA-seq analysis can make preliminary exploration on the expression regulation of cellulase genes. Expression of the genes in *C. globosum* was determined by different culture conditions. This study has shown a molecular system of cellulose-degradation in *C. globosum* and provides information for interpretation of carbohydrate metabolism.

Keywords: cellulase, *Chaetomium globosum*, RNA-Seq

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of China (30970084) and by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2007CB7078010)

* Corresponding Author. Tel /Fax: + 86-22-23506510; E-mail: xudong82@nankai.edu.cn

Received: 19 November 2012 / Revised: 4 January 2013

《微生物学报》综述文章投稿最新要求

2011年12月,第3次修订

为了避免篇幅庞大、罗列文献、内容空泛、缺乏观点,力求内容更加新颖、并更具可读性,自2003年本刊对综述类投稿提出了具体的要求,先后又作了两次修订。

1. 篇幅:主要刊登微型综述(mini review),来稿字数最好控制在5000字以内(不包括参考文献)。
2. 新意:选题要有新意,对读者及同行确有一定的启发作用和参考价值。
3. 述和评:结合文献扼要评述国内外学者在本领域的研究进展,不要泛泛罗列文献,只述不评。
4. 结合作:结合自己的研究工作,就该研究领域存在的问题和解决的途径提出自己的观点。
5. 参考文献:控制在40篇以内,近3年发表的文献不少于10篇。
6. 作者:(1)数量不多于3人;(2)提供一份背景材料,内容包括:第一作者科研简介、责任作者(即通讯作者)科研简介、本课题组对相关工作情况介绍(附已发文章)。

欢迎投送“能够反映国际研究热点、对学科发展有指导意义”的述评类文章。